

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Klaus Holidack)

Die Proliferationskinetik der Granulocytopoese
am ersten Kulturtag bei "normalem"
und megaloblastischem Knochenmark.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hartmut Röhling
aus Bünde

1969
—

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Klaus Holidack)

Die Proliferationskinetik der Granulocytopoese
am ersten Kulturtag bei "normalem"
und megaloblastischem Knochenmark.

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hartmut Röhling

aus Bünde

Dekan: Professor Dr.med. Hans Heinz Naumann
Referent: Priv.Do. Dr.med. Irene Boll
Korreferent: Professor Dr.med. Hans-Joachim Clemens



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13. März 1969

INHALT

A. Einleitung und Problemstellung	S. 4
B. Material und Methode	S. 11
C. Ergebnisse und deren Besprechung	S. 14
D. Zusammenfassung	S. 27
E. Abbildungen und Tabellen	S. 28
F. Literatur	S. 40



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung und Problemstellung.

Die Leukocyten, wahrscheinlich zum ersten Male als "Globules Blanc" von DE SENAC (30) 1749 im Blute beschrieben, entstehen im Knochenmark (7, 65), wo besondere Parenchyme ausschließlich der Blutbildung unterliegen (71). Im "Myelon", das im Gegensatz zur herdförmigen Anordnung des "Erythrins" (6, 83) gleichmäßig im Knochenmark verteilt ist (71), können wegen ihrer spezifischen morphologischen, cytochemischen und kinetischen Eigenschaften Promyelocyt, Myelocyt, Metamyelocyt, stabkerniger und segmentkerniger Granulocyt als aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien derselben Zelle angesehen und von den anderen leukopoetischen Knochenmarkpopulationen (Monopoese, Lymphopoese) getrennt werden (9, 74).

Dieses genealogische Schema der Granulocytopoese wird heute von den meisten Autoren anerkannt (13, 19, 48, 49, 71) und noch dahin erweitert, daß aus einer pluripotenten "Stammzelle" über den Myeloblasten der Promyelocyt entsteht (6, 29, 71). Die morphologische Struktur der "Stammzelle" ist noch immer ungeklärt, wird doch die große lymphoide Retikulumzelle (6, 13, 71), eine kleine Zelle mit stark basophilem Cytoplasma (27), und auch der Myeloblast (29, 71) dafür angesehen, weshalb im angloamerikanischen Schrifttum bei Bilanzuntersuchungen vom morphologisch nicht näher definierten "primitive progenitor pool" gesprochen wird (27).

Die experimentellen Methoden, die zur Aufstellung des genealogischen Schemas der Granulocytopoese geführt haben, bestehen einerseits in Differentialzählungen wiederholter Knochenmarkpunktate (in vivo), andererseits der Isolierung

von Knochenmarkpunktaten unter Kulturbedingungen (in vitro). Mit verschiedenen Versuchsansätzen (Zählung des Mitoseindex einschließlich der caryologischen Kurve, Mitoseblockierung mit Spindelgiften, Mikroautoradiographie nach Kernstoffwechselmarkierung, Reifungskurven, direkte Beobachtung von einzelnen Knochenmarkzellen im Mikroskop u. a. m.) ist es möglich, qualitative und quantitative Aussagen über den Ablauf des Wachstums im "Myelon" zu machen. Die Beurteilung der Proliferationskinetik wird aber dadurch erschwert, daß, wie in jedem Wechselgewebe, Regeneration und Differenzierung gleichzeitig nebeneinander ablaufen, und dadurch die quantitativen zeitlichen Veränderungen unübersichtlich gestaltet werden.

Bei den Untersuchungen in vivo lassen sich durch die mangelhafte Kenntnis über die Menge des hämocytopoetischen Knochenmarks und die Schwierigkeit, Lebensdauer und Menge der ausgeschütteten "reifen" Granulocyten festzustellen, die hintereinandergeschalteten granulocytopoetischen Entwicklungsstadien kaum quantitativ erfassen (17). Gleichzeitig sind die Ursachen des Übertritts "reifer" Granulocyten vom Knochenmark ins Blut unbekannt, und ihre Anzahl in Blut und Gewebe ist nur durch spezielle Verfahren (Leucopherese (24, 26)) zu ermitteln. So ist es für die Granulocytopoese weniger als für die Erythropoese - bei der wenigstens Lebensdauer und Menge der Erythrocyten im Blut bekannt sind - möglich, Bilanz aufzustellen.

In vitro-Untersuchungen haben dagegen den Vorteil, daß nervale (34, 55, 75) und humorale (21, 38, 45, 54, 56, 77) Faktoren und ebenso die Ausschüttung "reifer" Granulocyten

ins Blut (13) vernachlässigt werden können. Nur die zur Zeit der Punktion vorhandenen humoralen Stoffe können in vitro das Wachstum des Knochenmarks beeinflussen. So darf für die Granulocytopoese in vitro von einer geschlossenen Population ohne Zufluß- und Abflußmöglichkeiten (Stammzellen bzw. "reife" Granulocyten) gesprochen werden (10, 13, 39, 40, 41).

Unter verschiedenen Kulturbedingungen werden ähnliche zeitliche Veränderungen in der Zellzusammensetzung der granulocytopoetischen Populationen beschrieben (1, 13, 31, 50, 52, 53, 67). In flüssigen Kulturmedien (4, 66) sind absolute, in Deckglaskulturen (10, 22, 57, 79) nur relative Aussagen über die Zellzusammensetzung möglich. In vitro können die Veränderungen in der Zellzusammensetzung der granulocytopoetischen Knochenmarkpopulation in Abhängigkeit von der Zeit auf drei "eigengesetzliche Funktionen" der Knochenmarkzellen zurückgeführt werden (9):

1. Regeneration
2. Differenzierung
3. Degeneration.

Die Regeneration in der Granulopoese erfolgt durch mitotische Zellteilung (13, 16). Dadurch werden in den granulocytopoetischen Entwicklungsstadien: Myeloblast, Promyelocyt, Myelocyt einige Zellen verdoppelt, wodurch sowohl die absolute Gesamtzahl, wie auch der relative Anteil bei der teilungsfähigen granulocytopoetischen Knochenmarkpopulation erhöht wird.

Die Differenzierung (Reifung, Zelumwandlung von Reifungsstufen ineinander) ist durch morphologisch und cytochemisch

erfaßbare Veränderungen der Zellen gekennzeichnet (9, 12, 13, 62, 77), wonach die granulocytopoetischen Entwicklungsstadien des genealogischen Schemas charakterisiert sind. Bei der Reifung bleibt die absolute Gesamtzellzahl erhalten, doch die relative Zellzahl des ersten Entwicklungsstadiums verkleinert sich, während sich die des folgenden vergrößert. Da eine Differenzierung nacheinander in allen Entwicklungsstadien der Granulocytopoese stattfindet, ergibt sich eine scheinbare Abwanderung nach dem "reiferen" Stadium.

Eine Degeneration von Zellen findet entweder in allen granulocytopoetischen Entwicklungsstadien in vitro durch äußere Noxen statt (10, 13, 57, 67), oder aber bei den "reifen" Granulocyten physiologischerweise, wenn die "normale" Lebensdauer überschritten wird. Da eine Lysis schnell eintreten kann, entsteht dadurch sowohl eine Verringerung der absoluten wie auch der relativen Gesamtzellzahl. Auch in vivo wird, zumindest unter pathologischen Bedingungen, bereits im Knochenmark eine Zelldegeneration diskutiert, die sogenannte ineffektive Haematopoese (32).

Um die Beurteilung der Proliferationskinetik auf eine rationale, statistisch meßbare Grundlage stellen zu können, wurden unterschiedliche Modellvorstellungen für die Granulopoese entwickelt (19, 23, 24, 27, 28, 29, 39, 40, 41, 58, 59, 60, 61, 62, 68, 81). Das Verhalten der Granulocytopoese entspricht in vitro in einigen Zügen der Bevölkerungsbe-
wegung abgeschlossener Gebiete sowie dem radioaktiven Zerfall (39, 40, 41) und kann mit der mathematischen Theorie der Bevölkerungsstatistik (46, 70), der Zerfallstheorie (51), sowie der Theorie der Fließgleichgewichte (5) in seinen Gesetzmäßigkeiten formalisiert werden (33, 39, 40, 41).

Ausgehend von einem allgemeinen Modell der Hämocytopoese hat FUCHS (10, 39, 40, 41) an einem stochastischen Modell die Populationsentwicklung in abgeschlossenen Gebieten beschrieben, indem einem Entwicklungsstadium ein Zustandsraum und dem Entwicklungsprozeß der Übergang von einem Zustandsraum in den anderen zugeordnet wurde. Insgesamt führt der mathematische Ansatz allgemeiner Bilanzgleichungen zu einem System gekoppelter Differentialgleichungen für die Zellzahl der einzelnen Entwicklungsstadien, wobei die Zellzahl eines jeden Entwicklungsstadiums abhängig ist (Abb. 1):

1. von der Zellzahl zu einem früheren Zeitpunkt (Anfangs- oder Bezugswert) - N_{i0} - ,
2. von der Zeit, die seit der Bezugszeit verstrichen ist (t),
3. von einer Reihe von Parametern, welche die Teilungs- (m_i), Umwandlungs- (u_i) und Absterbewahrscheinlichkeit (s_i) eines jeden Entwicklungsstadiums kennzeichnen.

Zwar läßt sich auf Deckglaskulturen die absolute Zellverteilung nicht ermitteln, aber nach dem Stichprobenverfahren läßt sich der relative Zellanteil ($\mathcal{S}_i$) der einzelnen Entwicklungsstadien (Differentialzellbild der Population) genügend genau festlegen (10, 13, 39, 40, 41, 67). Ebenso sind die zeitlichen Parameter (m_i , u_i , s_i) durch verschiedene experimentelle Untersuchungen direkt (12, 72) oder indirekt mit rechnerischen Verfahren (1, 2, 17, 27, 35, 36, 37, 60, 63, 64, 69, 76) zu bestimmen. Damit eröffnen sich zwei praktische Anwendungsmöglichkeiten des stochastischen Modells.

1. Die Vorausberechnung der Zellverteilung für beliebige Zeiten, wenn die Anfangszellverteilung bei Anlegen der

Kultur (N_{i0}) und die Größe der zeitlichen Parameter (m_i, u_i, s_i) bekannt sind (Abb. 1).

2. Die Bestimmung einzelner unbekannter Parameter, wenn die Zellverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten bekannt ist und für die anderen Parameter bestimmte Näherungsannahmen gemacht werden können (11, 39, 40, 41).

Beide Möglichkeiten können allein oder auch alternierend angewandt werden. Für die vorliegende Arbeit soll aber nur die Vorausberechnung der Zellverteilung (1.) berücksichtigt werden. Dafür müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein:

1. Die insgesamt gezählte Zellzahl muß so groß sein, daß für die entsprechenden Aufenthaltswahrscheinlichkeiten, ohne zu große Fehler, die relativen Häufigkeiten gesetzt werden können.

2. Das betrachtete Zeitintervall muß genügend klein sein, damit

- a.) die Gesamtzellzahl und
- b.) die Wahrscheinlichkeit, daß mehr als ein Elementarprozeß in diesem Zeitraum stattfindet, vernachlässigt werden können,
und
- c.) die einzelnen Parameter während des Zeitraumes als zeitunabhängige Konstante angesehen werden können.

Ziel dieser Arbeit ist es: am stochastischen Modell der Hämocytopoese (39, 41) in vitro

1. die Veränderungen der Kinetik bei "normaler" Granulocytopoese in den ersten 48 Kulturstunden im Vergleich

gehäufte Stichproben mit nur täglichen Messungen nach BOLL (13, 17);

2. die Veränderung der Granulocytopoese bei megaloblastischer Anämie in ihrer Zellzusammensetzung zu überprüfen.

B. Material und Methode.

1. Material:

Die Untersuchungen wurden am Knochenmark dreier unterschiedlicher Probandengruppen ohne Berücksichtigung des Geschlechtes und Alters durchgeführt. Während einer stationären Behandlung wurden die Probanden aus diagnostischen Gründen sternalpunktiert. Ausgangspunkt für die Gruppeneinteilung war ausschließlich das weiße Blutbild der Probanden zur Zeit der Punktion. Für die Gruppen I und II war das Blutbild normal, worunter auch eine Leucocytenzahl bis $12000/\text{mm}^3$ und eine leichte Linksverschiebung im Differentialzellbild verstanden wurde. Für die Gruppe III wurde die klinische Diagnose einer megaloblastischen Anämie durch das Blutbild und die Beurteilung des Sternalpunktates gesichert. Lag eine Störung der Erythrocytopoese bei den Patienten der Gruppen I und II vor, so wurde angenommen, daß diese keine Rückwirkung auf die Granulocytopoese haben würde.

Die erste Untersuchungsgruppe bestand aus 24 Probanden mit normalem Knochenmark.

Die zweite Untersuchungsgruppe aus 13 Probanden mit normalem Knochenmark.

Die dritte Untersuchungsgruppe umfaßte 6 Probanden mit megaloblastischer Anämie.

2. Methode:

Das gewonnene Knochenmark wurde nach der von BOLL und FUCHS (10), in Anlehnung an die CARELLSCHE Technik (22), beschriebenen Methode der Gewebezüchtung im hängenden Koagulumtropfen in Kultur gesetzt. Der koagulierte Tropfen enthielt 50% autologes Plasma, 40% Hankslösung und 10% Corrhormon. Nach dem Koagulieren wurde das Knochenmark-

Bröckel aufgesetzt und ein weiteres Tröpfchen Serum überschichtet. Die durch Paraffin luftdicht abgeschlossenen Kulturen wurden im Brutschrank bei 37° C bis zu 3 Tagen bebrütet und zu bestimmten Zeiten ausgestrichen - in der Gruppe I von 24 Fällen nach 24 Std., 48 Std., 72 Std., in der Gruppe II bzw. III von 13 bzw. 6 Fällen nach 6 Std., 12 Std., 24 Std., 36 Std., 48 Std. und 72 Std. -, luftgetrocknet, fixiert und nach Pappenheim gefärbt.

Die panoptisch gefärbten Ausstrichpräparate wurden nach den von BOLL (13) angegebenen cytologischen Kriterien differenziert, wobei in der neutrophilen Granulocytopoese 6 morphologisch unterscheidbare Zellklassen gebildet wurden:

Myeloblast (MB), Promyelocyt (PM), Myelocyt (MY),
Metamyelocyt (MM), stabkerniger Granulocyt (StG),
segmentkerniger Granulocyt (SeG).

Die eosinophilen und basophilen Myelocyten sowie segmentkernigen Granulocyten wurden nicht gesondert berücksichtigt.

Da die absolute Zellzahl der granulocytopoetischen Knochenmarkpopulation auf Koagulumkulturen bei der Ausstrichtechnik nicht bestimmt werden kann, wurde nach dem Stichprobenverfahren der relative Anteil der einzelnen granulocytopoetischen Entwicklungsstadien bestimmt. In jedem Ausstrichpräparat wurden wenigstens 600 granulocytopoetische Knochenmarkzellen gezählt, wobei regelmäßig Randgebiete mit aufgelockertem Zellgehalt gewählt wurden. Das gewogene Mittel aller Differentialverteilungen wurde zu den bestimmten Zeitabschnitten ermittelt und zeitabhängig in Myelogrammen aufgetragen.

Die empirisch gewonnenen Werte wurden mit errechneten Werten verglichen, die nach dem stochastischen Modell der

Hämocytopoese bestimmt wurden (39, 41). Für die Berechnung wurden die Parameter der Teilungs- (m_1), Umwandlungs- (u_1) und Absterbewahrscheinlichkeit (s_1) nach experimentellen Untersuchungen (Mikroautoradiographie (23, 24, 29) und direkten Beobachtungen mit der Phasenkontrastoptik (9, 12, 13, 14, 15, 16)) festgelegt, wie sie in Tabelle 1 aufgezeichnet sind. Für eine zweite Berechnung wurden die Parameter der Teilungswahrscheinlichkeit (m_1) durch errechnete Werte aus Mitoseindex und Mitosedauer (13, 15, 16, 17) ersetzt (Tab. 2), wodurch sehr lange Zellverdopplungszeiten entstehen. Ausgangspunkt für die Vorausberechnung der Zellverteilung waren die Differentialverteilungen bei Anlegen der Kultur (φ_0).

C. Ergebnisse und deren Besprechung.

1. Zellmorphologie der Knochenmarkkulturausstriche.

a. pathologische Kernveränderungen:

An Kernveränderungen, die Ausdruck degenerativer Erscheinungen oder Schädigungen durch die Fixierung sein können, wurde eine verwaschene Struktur der Kerne, Atypien der Kernform, wie Eindellungen, Bildung von Ausbuchtungen, Bisegmentierung der segmentkernigen Granulocyten, Auflösung der Kernmembrane, Vorkommen von Kernabsprengungen und Zweikernigkeit beobachtet. Diese Kennzeichen waren bei länger bebrüteten Kulturen häufiger als im direkten Knochenmarkausstrich, auch zeigten sich Abweichungen an den Kernteilungsfiguren, z.B. Verklumpung der Chromosomen, besonders in der Metaphase.

b. pathologische Cytoplasmaveränderungen:

Cytoplasmaveränderungen fanden sich als ungefärbte Vakuolen, Körnelung des Plasmas, Vergrößerung der Granulation und teilweise auch toxische Granulation.

2. Veränderungen der Differentialverteilung der Granulocytopoese in vitro.

a. Gruppe I mit Stichproben nach 24, 48 und 72 Std.

Am Knochenmark von 24 Probanden mit normaler Granulocytopoese wurden insgesamt 80 993 granulocytopoetische Knochenmarkzellen gezählt und differenziert.

In den Abbildungen 2 und 3 sind die Veränderungen der Zellzusammensetzung innerhalb von 3 Kulturtagen dargestellt. Ausgehend von der Anfangsverteilung der Probandengruppe wurde nach dem stochastischen Modell und den Parametern der Tabelle 1 die wahrscheinliche Änderung der Zellzusammensetzung rechnerisch bestimmt. Bei einem Vergleich zwischen den gemessenen und den errechneten (a) Werten (Abb. 2) zeigte sich bis 48 Kulturstunden im allgemeinen eine befriedigende Übereinstimmung. Bei der 72. Kulturstunde stimmten Rechnung und Messung, wahrscheinlich wegen der überwiegenden Degeneration von Zellen, nicht mehr überein. Wurden der Berechnung (in Abb. 2) geänderte Parameter der Teilungswahrscheinlichkeit zugrunde gelegt (b), wie sie in Tabelle 2 aufgezeichnet sind, so ist keine Übereinstimmung zwischen Messung und Rechnung wie bei (a) vorhanden. Besonders die Diskrepanz bei den Entwicklungsstadien des Myelocyten und stabkernigen Granulocyten fällt ins Auge.

In der Reifungskurve (Abb. 3) werden deshalb die gemessenen Werte mit den errechneten Werten (a) verglichen, wobei die gleichen Aussagen wie zu Abb. 2 gemacht werden können.

b. Gruppe II mit Stichproben nach 6, 12, 24, 36 und 48 Std.

Am Knochenmark der Gruppe von 13 Probanden wurden insgesamt 66 521 granulocytopoetische Knochenmarkzellen gezählt und differenziert.

In Abbildung 4 werden die gemessenen Werte der Änderung der Zellzusammensetzung dieser Gruppe mit errechneten Werten nach dem stochastischen Modell verglichen, die aus den Ausgangswerten der Gruppe I und den Parametern der Tab. 1 bzw. 2 gewonnen wurden. Hierbei ergibt sich für die gemessenen Werte nicht die in der Gruppe I bei selteneren Stichproben beobachtete Veränderung in der Zellzusammensetzung. Sie ist vielmehr unstetig. Da unter den Probanden in einigen Fällen ein Blutbild mit einer leichten Leucocytose gefunden wurde, kann die Unstetigkeit der Messung entweder darauf oder auf die zu kleine Anzahl von Probanden zurückgeführt werden. Deshalb ist es nötig, die Homogenität der Gruppe zu prüfen. Bei einer multinominalen Verteilung, wie sie in dieser Gruppe vorliegt, eignet sich am besten der entsprechende χ^2 -Test (42). Das Ergebnis ist in Tab. 3 zusammengestellt, wobei nur die errechneten Sollwerte der multinominalen Verteilung eingetragen wurden. Insgesamt zeigt sich nach dem χ^2 -Test keine Homogenität in der Gruppe mit 13 Probanden, wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde gelegt wird. Um aber eine gewisse Homogenität der Gruppe zu erreichen, wurden die Probanden, die die stärkste Abweichung bei den Sollwerten im χ^2 -Test erreichten (in Tab. 3 unterstrichen), eliminiert. Dabei zeigte sich, daß die Abweichungen sowohl Probanden mit leichter Leucocytose wie auch solche mit normalem Differentialblutbild betrafen (Tab. 3).

Durch die Bereinigung der Gruppe von 13 auf 9 Probanden verringerte sich die Zahl der gezählten und differenzierten granulocytopoetischen Knochenmarkszellen auf 29 701.

In Abbildung 5 und 6 sind die gemessenen Werte der bereinigten Gruppe aufgetragen. Sie können mit den Werten, die

nach dem stochastischen Modell errechnet wurden, verglichen werden. Dabei liegen den Berechnungen wiederum die Parameter der Tab. 1 für (a) bzw. der Tab. 2 für (b) zugrunde. Bei dem Vergleich zwischen Messung und Rechnung (a) besteht eine gute Übereinstimmung für alle Entwicklungsstadien (Abb. 5), wobei fast sämtliche Werte nach 12 und 24 Kulturstunden übereinstimmen. Durch die Bereinigung der Gruppe von 13 auf 9 Probanden fielen die 6 Std.-Werte wegen zu geringer Zellzahlen fort. Später divergieren sie dahingehend, daß sich bei den gemessenen Werten die Granuloblasten (MB, PM, MY) allmählich vermindern, während sich der Anteil der "reifen" Granulocyten (MM, stG, seG) vermehrt. Diese Beobachtung entspricht für den ersten Kulturtag etwa der in Gruppe I. Auch nach 12 Std. entspricht dabei die Differentialverteilung der Berechnung nach dem stochastischen Modell (Abb. 5). Bei geänderten Parametern der Teilungswahrscheinlichkeit (Tab. 2) zeigt der Vergleich von Rechnung (b) und Messung keine Übereinstimmung. Deshalb werden in der Reifungskurve (Abb. 6) auch nur Messung und Rechnung (a) verglichen, wobei die oben gemachten Aussagen gelten.

c. Gruppe III mit Stichproben nach 12, 24, 36 und 48 Std.

Am Knochenmark der 6 Probanden mit megaloblastischer Anämie wurden insgesamt 21 583 granulopoetische Knochenmarkzellen gezählt und differenziert.

In Abbildung 7 ist wieder die Veränderung in der Differentialverteilung dargestellt. Die empirisch gewonnenen Werte der Änderung der Zellzusammensetzung können dabei mit den nach dem stochastischen Modell vorausberechneten Werten verglichen werden, die aus der Ausgangsverteilung der Probandengruppe und den Parametern der normalen Granulocytopoese (Tab. 1) gewonnen wurden. Zwischen Messung und

Rechnung zeigt sich für 12-24 Kulturstunden eine teilweise Übereinstimmung. Später tritt eine ähnlich der in Gruppe I und II beobachtete Divergenz auf, indem Granuloblasten abnehmen, während "reife" Granulocyten relativ zunehmen. Auffällig ist die starke Zunahme der Promyelocyten (PM) während der ersten 12 Kulturstunden und die dann folgende starke Abnahme, was nicht mit dem stochastischen Modell in Übereinstimmung gebracht werden kann.

3. Veränderungen des Mitoseindex der Granuloblasten und des G/E-Index in vitro.

a. Gruppe I:

Der Mitoseindex (MI) - Tab. 4 - nimmt während der ersten 24 Kulturstunden zu und danach bis zur 72. Kulturstunde ständig ab. Dabei zeigt sich in den einzelnen teilungsfähigen Entwicklungsstadien (MB, PM, MY einschließlich MM) ein unterschiedliches Bild. Während die Mitosen bei den Myeloblasten (MB) stetig abnehmen, nimmt die Anzahl der Mitosen bei PM und MY in den ersten 24 Kulturstunden zu, um sich danach erst stetig zu verringern.

Der G/E-Index erniedrigt sich in den ersten 24 Kulturstunden, was vielleicht auf eine schnelle Degeneration von segmentkernigen Granulocyten (seG) in vitro zurückgeführt werden kann, während er sich anschließend stark erhöht (Tab. 4).

b. Gruppe II:

Die Mitoseindices der 9 Probanden der bereinigten Gruppe zeigen ein anderes Verhalten wie die der Gruppe I. Der Mitoseindex nimmt insgesamt ständig ab (Tab. 5). Nur zwischen der 6. und 12. Kulturstunde (in Tab. 5 nicht aufgeführt) findet sich eine leichte Zunahme an Mitosen, was bei der unbereinigten Gruppe (12 Probanden) mit einem MI_G von 10,8‰ nach 6 Kulturstunden und einem MI_G von 12,9‰ nach 12 Kulturstunden zum Ausdruck kommt. Auch für die einzelnen Entwicklungsstadien zeigt sich eine fallende Tendenz des Mitoseindex (MI). Nur nach 12 Kulturstunden zeigen die Myeloblasten (MB) bei einem MI von 6‰ noch keine optimale Teilungsaktivität, was aber auf eine zu geringe Zellzahl zurückgeführt werden muß, da im unbereinigten Kollektiv nach 6 und 12 Kulturstunden mit 35 bzw. 41‰ ähnliche Werte wie in Gruppe I gefunden wurden.

Der G/E-Index zeigt nach der 12. Kulturstunde eine Erniedrigung, was die Annahme der schnelleren Degeneration der in Kultur gesetzten segmentkernigen Granulocyten als Ursache der G/E-Index-Erhöhung stützt, da eine so schnelle Erhöhung der Erythroblasten nicht möglich scheint. Bis zur 72. Kulturstunde erfolgt dann kein solcher starker Anstieg wie in Gruppe I.

c. Gruppe III.

Die Probanden mit megaloblastischer Anämie zeigen in den ersten 24 Kulturstunden einen steilen Anstieg der Mitoseaktivität (Tab. 6), wobei nach 12 Kulturstunden fast schon ein ebenso hoher Mitoseindex (MI) wie nach 24 Kulturstunden erreicht wird. Dabei steigt die Mitoseaktivität der Myeloblasten (MB) schon nach der 12. Kulturstunde stark, während Promyelocyten (PM) und Myelocyten (MY) erst nach 24 Kulturstunden eine Erhöhung des Mitoseindex zeigen. Gleichzeitig ist auch die relative Zellzusammensetzung nach 12 Kulturstunden stark zu den Promyelocyten (PM) - Abb. 7 - verschoben.

Da bei der megaloblastischen Anämie eine Rückwirkung der Erythropoese auf die Granulocytopoese nicht ausgeschlossen werden kann, sei hier angemerkt, daß sich bei den Erythroblasten derselben Probandengruppe in den ersten 12 Kulturstunden der Mitoseindex (r. MI) von 37,8‰ auf 44,5‰ erhöht, um dann bis zur 24. Kulturstunde wieder auf 32,8‰ abzusinken.

Der G/E-Index ist nach 12 Kulturstunden stark erhöht, was einmal auf die erhöhte Mitoseaktivität und die damit verbundene absolute und relative Zunahme der Zellzahl, zum anderen auf eine schnelle Ausreifung, eventuell auch Degeneration der Megaloblasten zurückgeführt werden kann.

4. Besprechung der Ergebnisse.

Die seit langem bekannten zeitlichen Veränderungen der Zellzusammensetzung der "normalen" Granulocytopoese in vitro (1, 3, 13, 31, 43, 50, 57) können durch die vorliegenden Ergebnisse (gemessene Werte) bestätigt werden. Vereinfacht wiedergegeben sind sie dadurch gekennzeichnet, daß einer Zellverschiebung zu den Granuloblasten (PM, MY) bis zur 24. - 48. Kulturstunde eine Verschiebung zu den "reifen" Granulocyten (StG, SeG) folgt. Die Beurteilung dieser Veränderungen in vitro ist umstritten, können sie doch als "degenerative Entartung" (57) oder als ein Überwiegen erst der Regeneration, später der Differenzierungsvorgänge (13, 78, 79, 80) angesehen werden. Morphologische, cytochemische und kinetische Kriterien werden zur Bewertung herangezogen.

Die morphologischen Beobachtungen widersprechen sich in einigen Punkten. An einzelnen Zellen der granulocytopoetischen Knochenmarkpopulation können mit zunehmender Kultivierungszeit degenerative Erscheinungen beobachtet werden (2, 50, 57), wie sie auch in den vorliegenden Ergebnissen nach 72 Kulturstunden anzutreffen sind. Eine Verringerung der Gesamtzellzahl der granulocytopoetischen Knochenmarkpopulation, wie sie für das flüssigē Kulturmedium nach 36 Stunden beobachtet werden kann (4, 66), könnte diese Beobachtung bestätigen, wird aber für die Koagulumkultur unwahrscheinlich gemacht (13, 79). Eine Verminderung der Vitalität einzelner Zellen kann unter dem Phasenkontrastmikroskop, wo granulocytopoetische Knochenmarkzellen über mehrere Tage beobachtet werden konnten (9, 10, 12, 13), ohne daß sie ihre Teilungs- und Reifungsfähigkeit verloren hatten, nicht nachgewiesen werden, obwohl durch die ständige Lichteinwirkung eine stärkere Schädigung der Zellen hervor-

gerufen werden dürfte als in den hier ausgewerteten Koagulumkulturen. Am Fermentstoffwechsel lassen sich auch nach 48 Kulturstunden noch keine pathologischen Veränderungen feststellen, wie auch Agranulocytosen in der Regenerationsphase in vitro ähnliche Veränderungen in der Zellzusammensetzung der Granulocytopoese zeigen wie in vivo (17). Übereinstimmend werden deshalb für 24-48 Kulturstunden die Ergebnisse in vitro mit denen in vivo verglichen (10, 13, 43, 57, 78).

Über das cytochemische Verhalten der "normalen" Granulocytopoese liegen nur wenige Ergebnisse vor. Die Beobachtung von SEITZ (73), daß die "Granulocyten" - es werden keine besonderen Entwicklungsstadien unterschieden - fähig sind, durch Glycolyse ihren Stoffwechsel aufrechtzuerhalten, kann nur so gedeutet werden, daß sie eine längere Lebenserwartung in vitro unter anaeroben Bedingungen besitzen können als z.B. die "Erythrocyten". Dieses würde auch mit den Ergebnissen des G/E-Index der "normalen" Granulocytopoese übereinstimmen, der für 24 - 48 Kulturstunden konstant bleibt, dann aber stark ansteigt.

Bei der Untersuchung der Kinetik der Granulocytopoese sollte die Einwirkung von Regeneration und Differenzierung immer gleichzeitig betrachtet werden (71). Mit dem stochastischen Modell der Hämocytopoese (39, 40, 41), dem ähnliche mathematische Vorstellungen zugrunde liegen wie anderen Modellen (18, 19, 23, 24, 27, 28, 29, 68), kann diese Forderung erfüllt werden. Für die Beurteilung der Änderung der Zellzusammensetzung der Granulocytopoese in vitro war eine der wichtigsten Voraussetzungen die Festlegung mittlerer zeitlicher Parameter der Teilungs-, Umwandlungs- und Absterbewahrscheinlichkeit der granulocytopoetischen Knochenmarkzellen. Obwohl die Verwendung zeitlicher Mittelwerte für bestimmte Zelleigenschaften (Mitosedauer, Zellverdoppelungszeit u. a.) problema-

tisch ist (20), ist es doch möglich, damit die Berechtigung des mathematischen Ansatzes des stochastischen Modells nachzuweisen (10, 39, 40, 41). Gegenüber anderen Untersuchungen am stochastischen Modell (10, 13, 39, 40, 41), bei denen auf die Mittelwerte aus den caryometrischen Messungen WEICKERS (81, 82) zurückgegriffen wurde, können in der vorliegenden Arbeit die zeitlichen Parameter auf die direkte Beobachtung im Phasenkontrastmikroskop (9, 12, 13) und mikroautoradiographische Untersuchungen (23, 24, 29) zurückgeführt werden.

Entgegen den Erwartungen, daß die Änderung der Zellzusammensetzung bis zu drei Tagen mathematisch befriedigend vorausberechnet werden kann (10, 39, 40, 41), konnte in den vorliegenden Untersuchungen zwischen Messung und Rechnung (a in Abb. 2 und 5) nur eine befriedigende Übereinstimmung für 24 - 48 Kulturstunden erzielt werden.

Eine Übereinstimmung konnte auch bei den segmentkernigen Granulocyten erzielt werden. Damit bestätigte sich die Vermutung, daß die Absterbewahrscheinlichkeit der segmentkernigen Granulocyten (seG) in vitro nicht vernachlässigt werden darf (10, 39, 40, 41). Dies wurde dadurch erreicht, daß den Berechnungen nach den Phasenkontrastbeobachtungen eine mittlere Lebensdauer der segmentkernigen Granulocyten von 18 Stunden (Tab. 1) zugrunde gelegt wurde (9, 12, 13). Da die Zellverschiebung von den Granuloblasten zu den "reifen" Granulocyten durch die Vorausberechnung nach dem stochastischen Modell nicht erfaßt werden können, müssen sich zwischen der 24. und 48. Kulturstunde die Voraussetzungen für die Berechnung geändert haben. Auch der Versuch, durch die Annahme größerer Parameter der Teilungswahrscheinlichkeit, die Zellverschiebung besser voraussagen zu können

(b in Abb. 2 und 5), hat zu keinem Zeitpunkt zu einer Übereinstimmung von Messung und Rechnung geführt. Da diese Parameter auf den Berechnungen aus Mitoseindex und Mitosedauer beruhen (13, 17), muß angenommen werden, daß sie keine reellen Werte für die Teilungswahrscheinlichkeit darstellen. Dies ergibt sich auch schon aus der Diskrepanz zwischen errechneten Werten aus Mitoseindex, stathmokinetischen Index und Mitosedauer und Werten, die durch Mikroautoradiographie oder direkte Beobachtung gewonnen wurden (13, 16, 17). Sie stellen wahrscheinlich nur Mittelwerte dar, in die sowohl die "ruhende" als auch die "reifende" Granulocytopoese Eingang findet (13, 14, 15, 16, 17).

Wenn bis zu 24 Kulturstunden die Änderung in der Zellzusammensetzung der "normalen" Granulocytopoese mit dem stochastischen Modell befriedigend genau vorausberechenbar ist, so darf geschlossen werden, daß in diesem Zeitintervall die Parameter als konstant angesehen werden können, was später nur noch bedingt vorausgesetzt werden kann. Da der Mitoseindex in den ersten 24 Kulturstunden nur geringe Schwankungen zeigt - schon nach 6 Stunden ist eine merkliche Anzahl von Mitosefiguren zu finden, die auch nach 12 und 24 Kulturstunden nicht wesentlich erhöht ist - wird die Änderung der Zellzusammensetzung zu gleichen Teilen durch die Regeneration und Differenzierung bestimmt sein. Das Auftreten zahlreicher Mitosefiguren nach 6 Kulturstunden muß so gedeutet werden, daß der Transplantationsschock (1) schon merklich überwunden sein muß, wie es auch andere Autoren vermuten (2, 13, 43). Somit entspricht das Zeitintervall vom Anlegen der Kultur bis zur 24. Kulturstunde den Voraussetzungen des stochastischen Modells. Unter pathophysiologischen Bedingungen, z.B. unter Einwirkung von Röntgenstrahlen und Colchicin wurde der Wirkungsmechanismus auf die granulopoetische

Knochenmarkpopulation bestimmt. Für diesen Zeitraum konnten schon Änderungen der Parameter erfolgreich nachgewiesen werden (11, 13, 39, 40, 41). Soll für einen längeren Beobachtungszeitraum das stochastische Modell zur Beurteilung der Änderungen der Zellzusammensetzung angewandt werden, so muß berücksichtigt werden, daß von der 24. bis zur 48. Kulturstunde die Parameter nur bedingt als konstant angesehen werden können. Besser wäre es, die Größe der Parameter ständig an den empirisch gewonnenen Werten zu orientieren. Dabei würde aber der Berechnungsvorgang so erschwert, daß nur die Verwendung von Datenverarbeitungs-maschinen zum Ziel führen würde (39, 41).

Die megaloblastisch veränderte Granulocytopoese zeigt in der Änderung der Zellzusammensetzung ähnliche Verschiebungen wie die "normale" Granulocytopoese. Die Zellverschiebung von den Granuloblasten - deren Vermehrung steiler als normal verläuft - zu den "reifen" Granulocyten beginnt aber schon nach 12 Kulturstunden. Dies wird auf eine beschleunigte Differenzierung zurückgeführt (13), was durch sogenannte "skipped divisions" (58, 59, 60, 61) hervorgerufen werden könnte. Der gleichzeitig stark erhöhte Mitoseindex könnte diese Ansicht bestätigen, da nach der 12. Kulturstunde der Anteil der Promyelocyten sich stark vermindert, während bei den Myelocyten der Anteil weiterhin zunimmt. Die ebenfalls beobachtete Verminderung der stabkernigen Granulocyten kann auf eine Reifungsbeschleunigung zurückgeführt werden. Das stochastische Modell ist mit normalen Parametern auf die megaloblastisch veränderte Granulocytopoese nur bedingt anwendbar.

Sowohl bei der "normalen" wie auch megaloblastisch veränderten Granulocytopoese zeigen die Myeloblasten (MB) eine

Übereinstimmung mit dem stochastischen Modell. Sie nehmen dabei weniger an den Zellverschiebungen zu den "reifen" Granulocyten teil, die von den Promyelocyten (PM) und Myelocyten (MY) auszugehen scheinen. Deshalb erscheint es annehmbar, den Promyelocyten (PM) und Myelocyten (MY) Stammzellfunktionen zuzuschreiben, wie dieses auch in der Annahme von morphologisch identischen, aber kinetisch unterschiedlichen "ruhenden" bzw. "reifenden" granulocytopoetischen Knochenmarkpopulationen geschieht (13, 14, 15, 16, 17, 25).

Bei der Änderung der Mitoseaktivität und der Zellzusammensetzung werden rhythmische bzw. wellenförmige Schwankungen diskutiert (3, 8, 43, 44, 47), wofür aber in den vorliegenden Untersuchungen kein Anhalt gefunden werden konnte.

D. Zusammenfassung.

1. Auf Koagulumkulturen kommt es bei der menschlichen Granulocytopoese zu charakteristischen zeitlichen Veränderungen in der Zellzusammensetzung, die in einer Zellverschiebung von den Granuloblasten zu den "reifen" Granulocyten gesehen werden können. Sie setzt bei der "normalen" Granulocytopoese nach 24 bis 48 Kulturstunden, bei der megaloblastisch veränderten Granulocytopoese nach der 12. Kulturstunde ein.
2. Für die "normale" Granulocytopoese können die Veränderungen mit dem stochastischen Modell der Hämoocytopoese (39, 41) für 24 Kulturstunden befriedigend genau vorausberechnet werden.
3. Nach 6 Kulturstunden finden sich schon in den Kulturen mit "normaler" Granulocytopoese ausreichend Mitosefiguren, so daß der "Transplantationsschock" überwunden zu sein scheint.

E. Abbildungen und Tabellen.

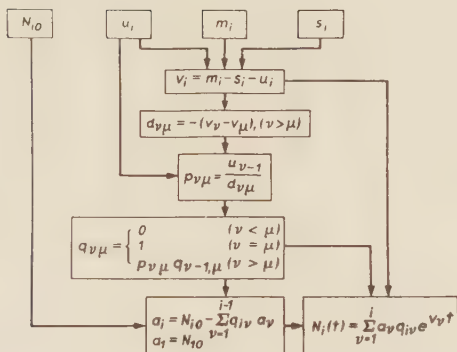


Abb. 1:

Schema des Rechenganges zur Vorausberechnung der Zellentwicklung aus den Ausgangswerten (N_{i0}) und den Parametern der Umwandlungs- (u_i), Teilungs- (m_i) und Absterbewahrscheinlichkeit (s_i) - (39, 41).

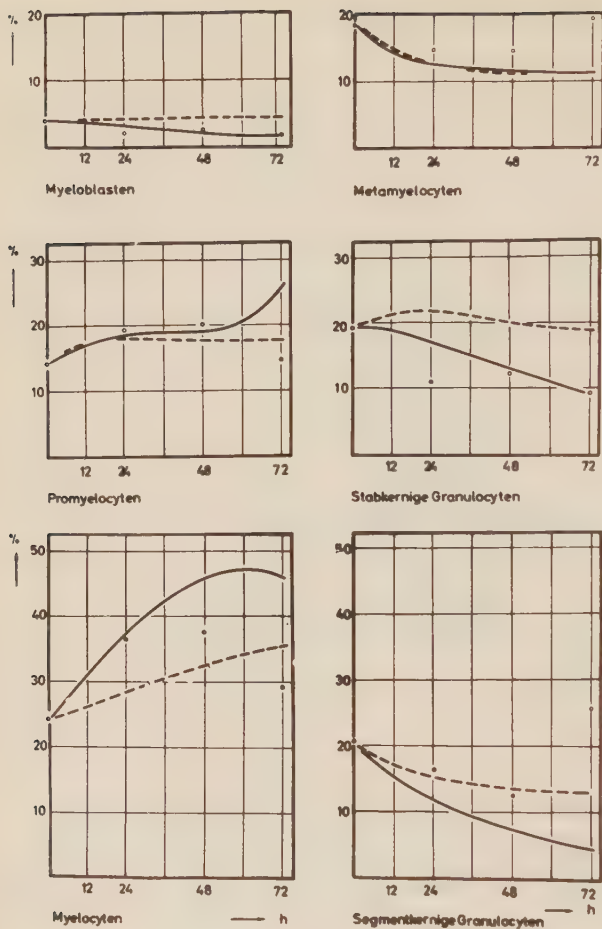


Abb. 2:

Vorausberechnung der normalen Granulocytopoese aus Anfangswerten und Parametern nach 24, 48 und 72 Std. (a nach Tab. 1, b nach Tab. 2). Vergleich zwischen Messung und Rechnung für die Gruppe I (24 Probanden). (— a, ---- b errechnete Werte; o gemessene Werte)

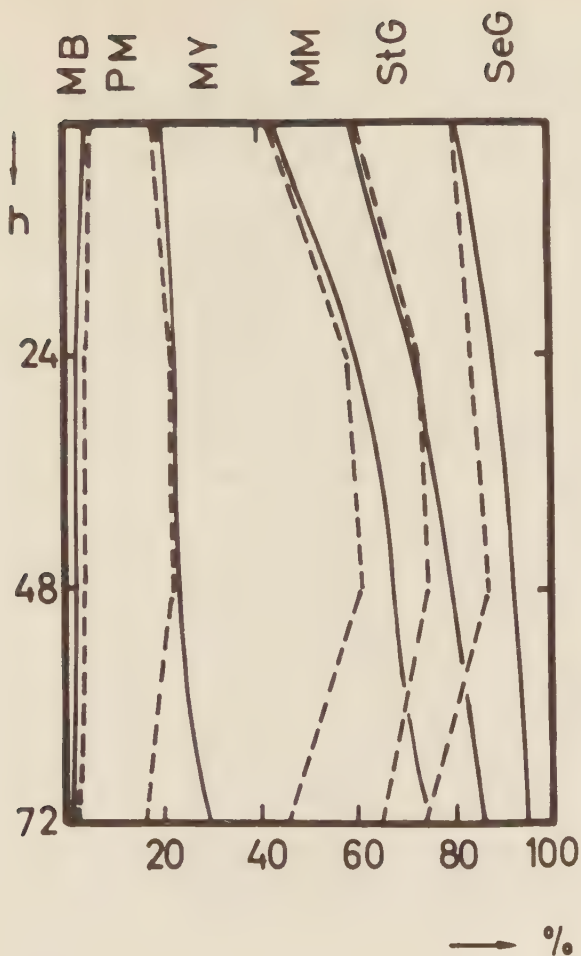


Abb. 3:

Myelogramm der Gruppe I (24 Probanden mit Vorausberechnung der Granulopoese aus Anfangswerten und Parametern (Tab. 1). Vergleich zwischen Rechnung und Messung (----- gemessene Werte, ——— errechnete Werte).

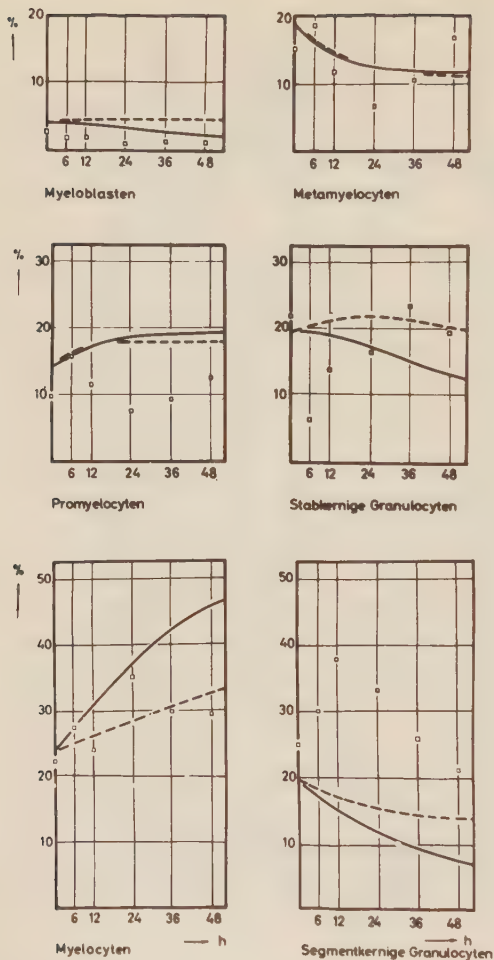


Abb. 4:

Vorausberechnung der Granulocytopoese der Gruppe II (12 Probanden) aus den Ausgangswerten und Parametern (a nach Tab. 1, b nach Tab. 2) nach 6, 12, 24, 36 und 48 Std. in vitro. Vergleich zwischen Messung und Rechnung. Gemessene Werte der Gruppe II und Berechnung wie in Abb. 2, wodurch sich unterschiedliche Anfangswerte ergeben. (— a, ----- b errechnete Werte, □ gemessene Werte).

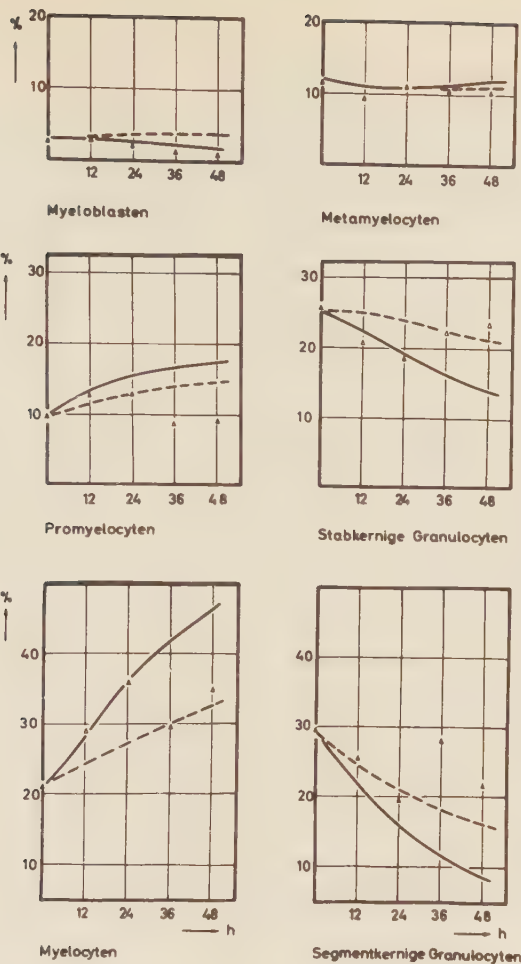


Abb. 5:

Vorausberechnung der Granulopoese aus den Anfangswerten und den Parametern (a nach Tab. 1, b nach Tab. 2). Vergleich zwischen Messung und Rechnung in der Gruppe II nach χ^2 -Test.

(— a, - - - - - b errechnete Werte, Δ gemessene Werte.

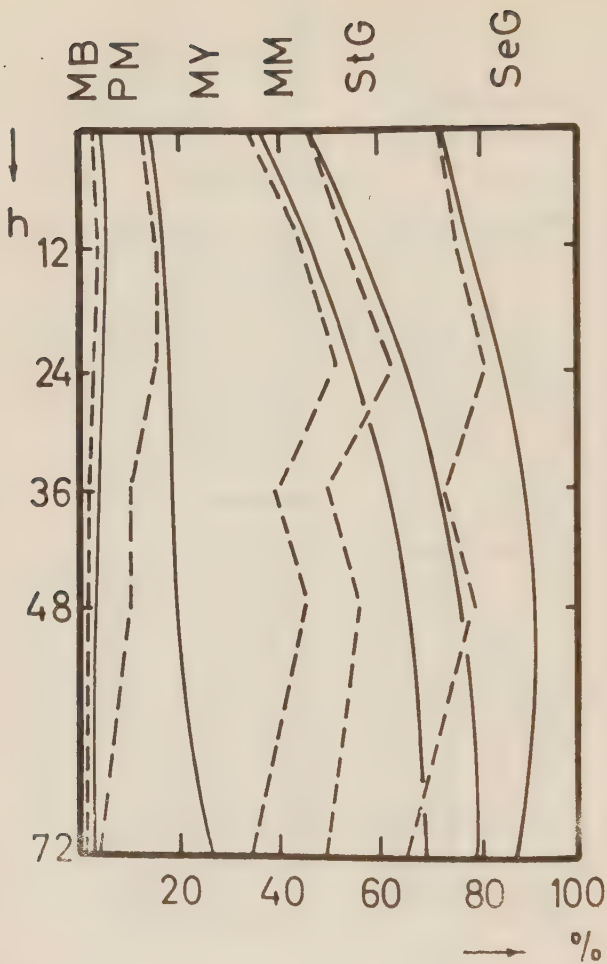
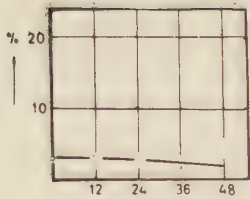


Abb. 6:

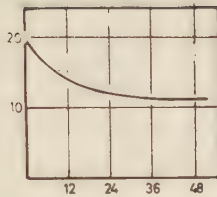
Myelogramm der Gruppe II mit Vorausberechnung der Granulopoese aus den Anfangswerten und Parametern der Tab. 1. Vergleich zwischen Messung und Rechnung.

----- gemessene Werte

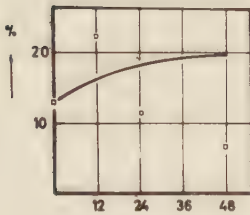
———— errechnete Werte



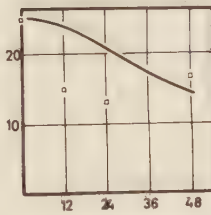
Myeloblasten



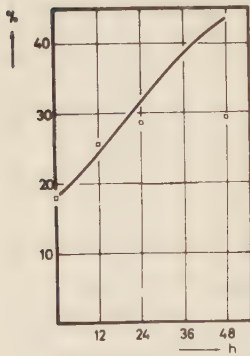
Metamyelocyten



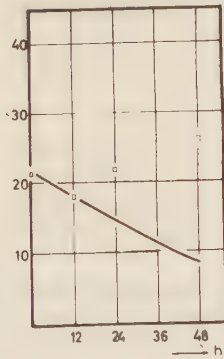
Promyelocyten



Stabkernige Granulocyten



Myelocyten



Segmentkernige Granulocyten

Abb. 7:

Vorausberechnung der Mega-Granulopoese aus den Ausgangswerten und Parametern (Tab. 1) nach 12, 24, 36 und 48 Std. in vitro.

(——— errechnete Werte, $\square$ gemessene Werte).

Zellklasse	Klasse	mittlere Lebens- dauer in Stunden	mittlere Verweil- dauer in Stunden	Zeit zwischen zwei Mitosen in Stunden
	i	$\frac{1}{s_i}$	$\frac{1}{u_i}$	$\frac{1}{m_i}$
Myeloblasten	1	∞	24	24
Promyelozyten	2	∞	48	30
Myelozyten	3	∞	60	30
Metamyelozyten	4	∞	20	∞
Stabkernige	5	∞	30	∞
Segmentkernige	6	18	∞	∞

Tab. 1:

Verwendete Zahlenwerte für die Parameter der normalen Granulopoese (∞ bedeutet bei der mittleren Lebensdauer, daß während der Versuchsdauer kein Absterben zu beobachten war, bei der Zeit zwischen 2 Mitosen, daß die Zellen die Teilungsfähigkeit verloren haben). Nach Phasenkontrastbeobachtung (9, 12, 13, 14, 15, 16).

Zellklasse	Klasse	mittlere Lebens- dauer in Stunden	mittlere Verweil- dauer in Stunden	Zeit zwischen zwei Mitosen in Stunden
	i	$\frac{1}{s_i}$	$\frac{1}{u_i}$	$\frac{1}{m_i}$
Myeloblasten	1	∞	24	24
Promyelozyten	2	∞	48	90
Myelozyten	3	∞	60	90
Metamyelozyten	4	∞	20	∞
Stabkernige	5	∞	30	∞
Segmentkernige	6	18	∞	∞

Tab. 2:

Verwendete Zahlenwerte für die Parameter der normalen Granulopoese (∞ wie in Tab. 1) nach Berechnungen aus Mitoseindex und Mitosedauer (13, 15, 16, 17) für $\frac{1}{m_i}$.
Andere Parameter wie in Tab. 1.

	Name	Leuco cytose	1 MB	2 PM	3 MY	4 MM	5 StG	6 SeG
1	Ba	-	<u>18,0</u>	3,5	2,3	0,0	<u>12,0</u>	0,5
2	H.W.	-	1,0	2,6	<u>11,2</u>	0,0	<u>26,5</u>	7,2
3	Li.	-	2,2	0,8	<u>11,5</u>	<u>12,5</u>	<u>13,0</u>	0,6
4	W.W.	+	0,2	0,4	3,1	1,0	0,6	0,3
5	W.K.	-	0,3	3,1	0,0	1,2	1,8	0,2
6	P.F.	-	0,4	0,1	1,0	0,3	0,3	0,0
7	W.P.	-	1,7	1,7	2,4	0,4	2,2	3,0
8	M.M.	+	0,5	3,6	4,6	1,0	3,6	3,0
9	B.E.	+	0,2	1,9	0,6	1,6	2,8	0,5
10	R.I.	+	0,1	2,2	0,6	1,1	0,4	2,6
11	St.G.	+	0,0	2,1	2,8	2,3	2,4	4,4
12	Ni.	+	0,2	<u>37,0</u>	0,1	4,1	<u>10,4</u>	8,4
13	G.M.	-	0,1	11,8	0,0	0,1	0,0	1,8

$$\chi^2 = 270,6; (P \geq 5\%)$$

Tab. 3:

Ergebnis des χ^2 -Testes für multinominale Verteilungen zum Nachweis einer Homogenität in der Gruppe II (13 Probanden). Aufgetragen sind nur die Sollwerte. Unterstrichen sind die Sollwerte, die die stärkste Abweichung zeigen und wovon im bereinigten Kollektiv (9 Probanden) kein Patient berücksichtigt wurde.

Mitoseindex				
%o	0 h	24 h	48 h	72 h
(MI) gesamt	13,4	15,0	11,0	5,0
MB	44,2	34,1	29,7	-
PM	14,2	20,0	17,1	10,9
MY	10,4	12,2	7,5	3,5

G/E-Index	3,7	3,3	4,1	7,0
-----------	-----	-----	-----	-----

Tab. 4:

Veränderungen des Mitoseindex (MI) und des
G/E-Index in der Kultur (Gruppe I mit 24 Probanden).

Mitoseindex						
%o	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
(MI)gesamt	19,9	13,2	10,8	9,8	9,8	4,5
MB	41,5	6,0	27,0	31,3	-	-
PM	31,2	23,2	16,3	(23,7)	(28,1)	8,4
MY	14,8	10,4	9,0	6,1	6,4	4,3
G/E-Index	4,3	2,8	3,8	4,3	3,8	5,0

Tab.5: Veränderungen des Mitoseindex (MI) und des G/E-Index in der Kultur (Gruppe II nach χ^2 -Test: 9 Probanden).

Mitoseindex						
%o	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
(MI)gesamt	10,9	16,3	18,8	12,8	10,8	9,1
MB	31,0	55,5	30,6	-	6,2	-
PM	16,0	16,2	28,7	-	8,2	-
MY	15,8	22,5	28,6	-	18,3	-
G/E-Index	0,7	1,3	0,6	1,9	1,4	1,2

Tab. 6: Veränderungen des Mitoseindex (MI) und des G/E-Index in der Kultur bei megaloblastischer Anämie (Gruppe III mit 6 Probanden).

F. Literatur.

1. ASTALDI, G. e C. MAURI: La valutazione dell'attività proliferative delle cellule midollari. Studio di un "Test Statmokinetico".
Haematologica 33: 13 (1949).
2. ASTALDI, G. e C. MAURI: La durata della mitosi delle cellule ematopoietiche. Studio di un "Test Cronomitotico".
Haematologica 37: 9 (1953).
3. BEGEMANN, H. und W. HEMMERLE: Die Mitosetätigkeit des menschlichen Knochenmarks und ihre Beeinflussung durch cytotatische Substanzen.
Klin. Wschr. 27:530 (1949).
4. BERNADELLI, E.: Culture en milieu liquide des cellules hemopoietiques.
Schweiz. Med. Wschr. 91: 1157 (1961).
5. BERTALANFFY, L.v.: Theorie der Fließgleichgewichte.
Vieweg Verlag, Braunschweig 1953.
6. BESSIS, M.C.: Cytology of the Blood and Blood-Forming-
Organs.
Grune and Stratton, N.Y. and London 1956.
7. BIZZOZERO, J.: Sulla funzione emapoetica del midollo delle ossa.
Gazz. med. ital. 1868.
8. BOLL, I. und H.-G. MEHL: Phosphoraufnahme von Plasmocytom- und normalen Knochenmarkszellen in vitro.
Klin. Wschr. 34: 157 (1956).

9. BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. - Ausreifung eines Myelocyten zum Segmentkernigen.
Fol. haemat. N.F. 3: 78 (1958).
10. BOLL, I. und G. FUCHS: Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut 7: 257 (1961).
11. BOLL, I. und G. FUCHS: Unterschiedliche Strahlenwirkung auf Leuko- und Erythropoese in vitro.
8. Kongr. Eur. Ges. Hämatol. Wien 1961.
S.Karger Verlag, Basel und N. Y.: 339 (1962).
12. BOLL, I.: Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. V.Mitt.: Verhalten der Granuloblasten während der Interkinese.
Blut 11: 326 (1965).
13. BOLL, I.: Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer Verlag, Heidelberg 1966.
14. BOLL, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Granulopoese.
Fortschritte d. Medizin 4: 127 (1966).
15. BOLL, I. und G. FUCHS: Cell Renewal in Granulocytopoiesis.
Exp. Haemat. 12: 85 (1967).
16. BOLL, I.: Die Regeneration in der Granulopoese.
Verh. d. Dt. Ges. für Pathologie. 50. Tag. Heidelberg 1966.
G. Fischer Verlag, Stuttgart : 234 (1966).
17. BOLL, I.: Die Proliferationskinetik der normalen und leukämischen Granulopoese.
4. Tagung Arb. Gemeinsch. Haemat. u. Blutspendewes. d. DDR, Berlin 1967.

18. BOND, V.P.: Strahlenbiologische Grundlagen der strahleninduzierten Knochenmarkschädigung.
44. Tag. Dt. Rönt.-Ges., Baden-Baden: 1 (1963).
19. BOND, V.P., T.M. FLIEDNER and J.O. ARCHAMBEAU: Mammalian Radiation Lethality. A Disturbance in Cellular Kinetics.
Academic Press, N.Y. and London 1965.
20. BUDINGER, T.F. and R.J. HOWERTON: Characterizations of the Time Variations of Reproductive Processes in Living Cells.
Nature 214; 5086: 397 (1967).
21. BULLOUGH, W.S.: Hormones and Mitotic Activity.
Vit. and Horm. 13: 261 (1955).
22. CARREL, A. and A.H. EBELING: Pure Cultures of Large Mononuclear Leukocytes.
J. exp. 36: 365 (1922).
23. CARTWRIGHT, G.E., J.W. ATHENS, D.R. BOGGS and M.M. WINTROBE: The Kinetics of Granulopoiesis in Normal Men.
Series Haematol. 1: 1 (1965).
24. CARTWRIGHT, G.E., J.W. ATHENS, O.P. HAAB, S.O. RAAB, D.R. BOGGS and M.M. WINTROBE: Blood Granulocyte Kinetics in Conditions Associated with Granulocytosis.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 113: 963 (1964).
25. COWDRY, E.V.: Cells and their Behavior.
Pathology Anderson: 5 (1953).
26. CRADDOCK, Ch.G.: Cellular Proliferation in Normal and Leucemic States as Reflected by in vitro DNA-Synthesis.
IX. Congr. Int. Soc. Hemat. Mexico 1962.

27. CRONKITE, E.P., T.M. FLIEDNER, V.P. BOND and J.S. ROBERTSON: Anatomic and Physiologic Facts and Hypotheses about Hemopoietic Proliferating Systems. In: F. STOHLMAN "The Kinetics of Cellular Proliferation". Grune and Stratton, N.Y. and London: 1 (1959).
28. CRONKITE, E.P.: The Structure of Models for Erythropoietic and Granulopoietic Proliferation. X. Intern. Haemat. Kongr., Stockholm 1964, Nr. E.
29. CRONKITE, E.P. and T.M. FLIEDNER: Granulopoiesis. New Engl. J. Med. 270: 1347, 1403 (1964).
30. de SENAC, J.B.: Traite de la structure du coeur. J. Vencent, Paris 1749.
31. FIESCHI, A. e G. ASTALDI: La cultura in vitro del midollo osseo. Haematol. 8: 173 (1946).
32. FINCH, S.C. and J.W. HOLLINGWORTH: Cross-Circulating Experiments in Elucidating the Viability and Distribution of Leukocytes. Ann. N.Y. Acad. Sci. 77: 431 (1959).
33. FIRESCU, D. and TAUTU, P.: On a Stochastic Model of Haematopoiesis. Studii si cercet. matem. in Druck.
34. FLEISCHHACKER, H.: Über die zentrale Regulation der Leukocyten. Wien. Klin. Wschr. 67: 724 (1955).
35. FLIEDNER, T.M., E.P. CRONKITE and V.P. BOND: Die Proliferationsdynamik der Blutzellbildung. Autoradiographisch untersucht mit tritiummarkiertem Thymidin. Schw. Med. Wschr. 41: 1061 (1959).

36. FLIEDNER, T.M., E.P. CRONKITE and V.P. BOND:
Die Untersuchung des myelopoetischen Zellumsatzes
in Knochenmark und Blut.
Nucl.-Med. Suppl. 1: 445 (1963).
37. FLIEDNER, T.M. and E.P. CRONKITE: Reifung, Lebens-
erwartung und Schicksal neutrophiler Granulocyten.
Med. Welt 10: 466 (1964).
38. FLIEDNER, T.M., J. FACHE und C. ADOLPHI:
Über die Umsatzkinetik der Leukocyten bei keim-
freien Mäusen.
Schw. Med. Wschr. 37: 1236 (1966).
39. FUCHS, G.: Mathematische Theorie der Entwicklung einer
in vitro isolierten Knochenmark-Population und
deren Anwendungsmöglichkeiten.
Blut 11: 267 (1965).
40. FUCHS, G.: Das Bevölkerungsmodell als Hilfsmittel zur
Beurteilung von Verlauf und Therapieerfolg bei
malignen Neoplasmen des Blutes.
In: G. WAGNER (Hrsg.) "Krebs-Dokumentation
und Statistik maligner Tumoren". (F.K.Schattauer
Verlag, Stuttgart) : 281 (1966).
41. FUCHS, G.: Theorie und Praxis stochastischer Modelle
für die Entwicklung von in vitro isolierten
Knochenmarkpopulationen.
In: "Methodik der Information in der Medizin"
2: 86 (1966). F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart.
42. Geigy Dokumenta, Wissenschaftliche Tabellen.
J.R. Geigy, Basel 6: 170. 22 (1960).
43. GERHARTZ, H.: Habilitationsschrift Berlin (1958).
44. GOLDECK, H.: Periodizität der Blutbildung während der
24 Stunden des Tages.
Folia clin. intern. 3: 303 (1953).

45. GORDON, A.S.: Some Aspects of Hormonal Influences upon the Leukocytes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 59: 907 (1955).
46. HARRIS, T.E.: A Mathematical Model for Multiplication by Binary Fission.
In: F. STOHLMAN "The Kinetics of Cellular Proliferation". Grune and Stratton, N.Y. and London: 368 (1959).
47. HALBERG, F. and R.B. HOWARD: 24 Hour Periodicity and Experimental Medicine.
Postgrad. Med. 24: 349 (1958).
48. HEILMEYER, I.: Hdb. d. ges. Hämatol. II.
Urban und Schwarzenberg, München 2: 332 (1960).
49. HEILMEYER, L. und HITTMAYER, A.: Hdb. d. ges. Hämatol. Bd. 1. Urban und Schwarzenberg, München 1957.
50. HERTL, M. und K. THOMAS: Cytochemische Untersuchungen an Knochenmarkszellen in der Kultur.
Folia haemat. N.F. 3: 351 (1959).
51. ISRAEL, H.: Radioaktivität Bd. 1.
J.A. Barth, Leipzig 1940.
52. KILLMANN, S.A., E.P. CRONKITE, T.M. FLIEDNER and V.P. BOND: Mitotic Indices of Human Bone Marrow Cells. I. Number and Cytologic Distribution of Mitoses.
Blood 19: 743 (1964).
53. KILLMANN, S.A., E.P. CRONKITE, V.P. BOND and T.M. FLIEDNER: Mitotic Indices of Human Bone Marrow Cells. III. Duration of Erythrocytic and Granulocytic Proliferation Computed from Mitotic Indices.
Blood 24: 267 (1964).

54. KLEINSORGE, H. und G. BOLLAND: Regulationsabläufe
im weißen Blutbild sowie in den Mineral-,
Blutzucker- und Vit.B₁₂-Spiegeln des Serums
nach seelischen Erregungen.
Med. Klin. 51: 1736 (1956).
55. KOMIYA, E.: Die zentralnervöse Regulation des Blutbildes.
Thieme Verlag, Stuttgart 1956.
56. KUTZKY, R.J. and Th. v. FEICHTMEIR: Mitosis-
Stimulating Properties of Embryonic Nucleoprotein
Constuents in Cell Culture.
Nature 194: 1050 (1962).
57. LAJTHA, L.G.: The Culture of Bone Marrow Cells in vitro.
Brit.med. Bull. 15: 47 (1959).
58. LAJTHA, L.G.: Haemopoiesis, Ciba Foundation Symposion.
Churchill, London 1960.
59. LAJTHA, L.G.: Stem Cell Kinetics and Erythropoietin.
Erythropoiesis 140 (1962).
60. LAJTHA, L.G., R. OLIVER and C.W. GURNEY:
Kinetic Model of a Bone-Marrow Stem-Cell-
Population.
Brit. J. Haemat. 8: 442 (1962).
61. LAJTHA, L.G., C.W. GILBERT, D.D. PORTEOUS and
R. ALEXANIAN: Kinetics in a Bone-Marrow-Stem-
Cell-Population.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 113 : 742 (1964).
62. LENNERT, K.: Bildung und Differenzierung der Blutzellen,
insbesondere der Lymphocyten.
Verhdl. d. Dtsch.Ges. f. Pathologie, 50.Tg. 1966.
1966, Stuttgart, Fischer S. 163.

63. MÜLLER, D.: Untersuchungen zur Proliferationsdynamik
der normalen und pathologischen Granulopoese.
Med. Welt 52: 2675 (1963).
64. MÜLLER, D.: Desoxyribonucleinsäurebestimmungen in
den Leukocyten der normalen und leukämischen
Granulopoese.
Klin. Wschr. 42: 224 (1964).
65. NEUMANN, E.: Über die Bedeutung des Knochenmarks
für die Blutbildung.
Zbl. med. Wiss. 6: 689 (1868).
66. OSGOOD, E.E. and A.N. MUSCOWITZ:
Culture of Human Bone-Marrow.
J. amer. med. Ass. 106: 1888 (1936).
67. OSGOOD, E.E.: Number and Distribution of Human
Hemic Cells.
Blood 9: 1141 (1954).
68. OSGOOD, E.E.: Regulation of Cell-Proliferation.
In: "The Kinetics of Cellular Proliferation",
F. STOHLMAN. N.Y. and London: Grune and
Stratton 1959, p. 282.
69. PATT, H.M. and M.A. MALONEY: Kinetics of Neutrophil
Balance. In: "The Kinetics of Cellular Proliferation",
F. STOHLMAN. N.Y. and London: Grune and
Stratton 1959, p. 201.
70. RIGAS, D.A.: Dynamics of Cell Proliferation and
Isotope-Incorporation into DRN. Acid.
In: "The Kinetics of Cellular Proliferation",
F. STOHLMAN. N.Y. and London: Grune and
Stratton 1959, p. 408.
71. ROHR, K.: Das menschliche Knochenmark.
1960, Stuttgart: Thieme Verlag, 3. Aufl.

72. RONDANELLI, E.G., P. GORINI e D. PECORARI:
Influence of Differentiation and Maturation upon
the Time Cycle of Mitosis in normal Hemopoietic
Cells Cultivated in Vitro.
Haematologica Latina II: 35 (1959).
73. SEITZ, J.F.: Biochemistry of Normal and Leucemic
Leucocytes, Thrombocytes, and Bone-Marrow-Cells.
Adv. Cancer Res. 9: 304 (1965).
74. SCHILLING, V.: Das Knochenmark als Organ.
Dtsch. Med. Wschr. 51: 261 (1925).
75. SCHILLING, V.: Neurohormonale Regulierung des Blutes.
V. Europ. Hämatol. Kongr. Freiburg 1955 Nr. 47.
76. TAMBURINO, G., P. MAGNANELLI e U. SALERA:
Sintesi dell'ADN e attività proliferativa delle
cellule mieloidi. II. Ricerche Citoautoradiografiche
mediante impiego di P^{32} sui granuloblasti medollari,
normali e leucemici.
Bolletino di Oncologica XXXI: 5, 3 (1957).
77. TEIR, H.: Neubildung und Abbau der Granulocyten.
Vhdlg. d. Dtsch. Ges. f. Pathologie, 50. Tg. 1966.
1966, Stuttgart: Fischer S. 220.
78. THOMAS, C.: Leukämie im Kindesalter. Über Beobach-
tungen von Reifungseffekten in vitro.
VI. Europ. Hämatol. Kongr., Kopenhagen 1957.
79. THOMAS, C. und SEIDLER, E.: Knochenmark in vitro.
VI. Europ. Hämatol. Kongr., Kopenhagen 1957.
80. THOMAS, K. und E. SEIDLER: Knochenmark in vitro
unter Einfluß cytostatischer und hormoneller
Substanzen.
Folia haemat. 4: 121 (1960).

81. WEICKER, H.: Ein quantitatives Modell der Granulopoese.
Schw. Med. Wschr. 51/52: 1459 (1956).
82. WEICKER, H.: Zellteilung und Zellteilungsstörungen.
In: HEILMEYER-HITTMAYER: Hdb. d. ges. Hämatologie I, 148, 1957, München, Urban und Schwarzenberg.
83. WEICKER, H.: Morphologie und Kinetik der normalen und pathologischen Erythropoese.
Folia haematol. N. F. 9: 153 (1964).

Mein aufrichtiger Dank gilt Frau Priv.Do^z. Dr. I. Boll
für Ihre Einführung in die Hämatologie und die Überlassung
dieses Themas und Herrn Prof. Dr.Dr. G. Fuchs für
seine Unterstützung bei den mathematisch-statistischen
Berechnungen.

LEBENS LAUF

28. Juni 1940 geboren als Sohn des Amtsgerichtsrats
Friedrich Röhling und seiner Ehefrau
Martha in Bünde/Westf. .
- 1947-1961 Besuch der Grundschule und Mittelschule
in Rahden und des Söderblom-Gymnasiums
in Espelkamp-Mittwald.
21. Februar 1961 Abitur am Söderblom-Gymnasium.
- SS 1961 - WS 1967/68 Studium der Medizin und Zahnheilkunde
an den Universitäten in Münster und
Berlin.
18. Juli 1966 Zahnärztliche Prüfung in Berlin.
22. August 1966 Bestallung als Zahnarzt durch den Senator
für Gesundheitswesen in Berlin.
Z.Zt. beschäftigt als Assistent in einer
kieferchirurgischen Fachpraxis in
Berlin-Schöneberg.

